

密蒙花花蕾不同提取部位的抗氧化活性研究^Δ

杨再波*, 谌连桃, 吴应红, 贺银菊(黔南民族师范学院化学与化工系, 贵州 都匀 558000)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)01-0032-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.01.10

摘要 目的:比较密蒙花花蕾不同提取部位的体外抗氧化活性。方法:用60%乙醇提取密蒙花花蕾得乙醇粗提物(ET),用水分散后,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取ET得各部位样品PE、EA、BU和水部位样品(SH);以二丁基羟基甲苯(BHT)为阳性对照。采用1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH)、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)自由基清除法和铁离子还原/抗氧化能力分析(FRAP)法分别考察各部位样品的抗氧化能力,计算半数抑制浓度(IC₅₀)及抗氧化当量TEAC值。结果:与其他部位样品比较,ET与EA具有较强的抗氧化活性,EA清除DPPH、ABTS自由基的IC₅₀分别为13.75、9.78 μg/ml,ET为14.93、11.41 μg/ml;EA对DPPH自由基的清除能力强于BHT(IC₅₀为18.71 μg/ml)。EA、ET、BHT的TEAC值分别为1 657.67、1 586.25、1 581.68 μmol/g。结论:密蒙花花蕾的乙酸乙酯提取物具有较好的抗氧化能力。

关键词 密蒙花花蕾;抗氧化活性;自由基;清除率;提取部位

Study on Antioxidant Activity of Different Extraction Parts from Flower Buds of *Buddlejae flos*

YANG Zaibo, CHEN Liantao, WU Yinghong, HE Yinju (Dept. of Chemistry and Chemical Engineering, Qiannan Normal University for Nationalities, Guizhou Duyun 558000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare antioxidant activity of different extraction parts from flower buds of *Buddlejae flos* in vitro. METHODS: Ethanol crude extract (ET) was extracted from flower buds of *B. flos* with 60% ethanol and diffused by water; and petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol were used to extract ET to obtain PE, EA, BU and water samples (SH). Using di-butyl hydroxy toluene (BHT) as positive control, the antioxidant capacity of PE, EA, BU and SH were investigated by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2, 2'-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) free radical scavenging method and ironion reduction/oxidation resistance ability (FRAP) method. IC₅₀ and antioxidant equivalent TEAC were calculated. RESULTS: Compared with other samples, ET and EA had stronger antioxidant activity, and IC₅₀ of EA scavenging DPPH and ABTS free radical were 13.75, 9.78 μg/ml, and those of ET were 14.93, 11.41 μg/ml; scavenging ability of EA to DPPH free radical was stronger than that of BHT (IC₅₀ was 18.71 μg/ml). TEAC of EA, ET and BHT were 1 657.67, 1 586.25 and 1 581.68 μmol/g. CONCLUSIONS: The ethyl acetate extract from flower buds of *B. flos* has good antioxidant activity.

KEYWORDS Flower buds of *Buddlejae flos*; Antioxidant activity; Free radical; Scavenging rate; Extract part

- [1] 赵文静, 汪建伟, 常惟智, 等. 仙鹿消癥胶囊对乳腺增生模型小鼠血管生成因子 VEGF、bFGF、MVD 表达的影响[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(3): 74.
- [2] 李才, 任立群. 病理模型与实验病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 462.
- [3] 王雄, 吴金虎, 陈永刚, 等. 回乳抑增 I 号对实验性乳腺增生大鼠的作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 274.
- [4] 张科伟, 付彤, 任立群, 等. 乳痛宁对大鼠乳腺增生模型的作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2006, 32(3): 413.
- [5] 张拴成, 肖红玲, 王丽娜, 等. 消瘀通络散对乳腺增生模型大鼠血清激素水平的影响[J]. 山东中医杂志, 2012, 31(7): 511.
- [6] 王灿, 苗明三. 乳络通胶囊对小鼠乳腺增生模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 259.
- [7] 陈莎莎, 郭巧生, 金融, 等. 乳块消方对实验性乳腺增生大鼠的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1 198.
- [8] 段好刚, 魏玉辉, 李波霞, 等. 疏乳消块方不同溶媒提取物对大鼠乳腺增生的治疗作用[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(10): 1 058.
- [9] 常秀娟, 周军, 张帅, 等. 桂枝茯苓胶囊对乳腺增生大鼠性激素水平和乳腺组织的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4 139.
- [10] 乔丽莉. 红金消结胶囊联合他莫昔芬治疗绝经后妇女乳腺增生症的疗效观察[J]. 中国药房, 2013, 24(16): 1 502.
- [11] 黄月玲, 文端成, 韦永芳, 等. 大鼠乳腺增生模型的建立[J]. 广东医学, 2002, 23(4): 362.

Δ 基金项目: 2013 年贵州省科技联合基金项目 (No. 黔科合 J 字 LKQS[2013]02 号); 2014 年贵州省省级大学生创新创业训练计划项目 (No. 黔教办高[2014]321 号); 2014 年贵州省普通高等学校民族药用植物资源开发工程研究中心资助项目 (No. 黔教合 KY 字[2014]227 号)

* 教授。研究方向: 天然产物化学、药物设计与合成。E-mail: yzb1976110@sohu.com

(收稿日期: 2015-07-14 修回日期: 2015-08-31)

(编辑: 林 静)

密蒙花(又名黄饭花)为马钱科醉鱼草属植物密蒙花(*Buddleja officinalis* Maxim.)的干燥花蕾及花序^[1-2],具有药食两用的价值,在贵州各地均有一定的分布,特别是贵州黔南地区。研究表明,密蒙花的花蕾具有清肝利尿、明目退热、抗菌消炎、镇静止咳之功效^[1-2]。对其化学成分的研究表明,密蒙花的花蕾主要含黄酮类、苷类,苯乙醇苷类、苯丙素酚苷、三萜及其皂苷类、黄色素成分蒙花苷以及挥发油类等^[3]。近年来,关于密蒙花化学成分的分离、鉴定与药理活性研究已有相关报道,而关于不同溶剂提取物的抗氧化活性研究的相关文献报道较少。因此,笔者采用1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH)、2,2'-联氨-双(3-(2-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)自由基清除法和铁离子还原/抗氧化能力分析(FRAP)法^[4-6]分别测定密蒙花花蕾60%乙醇提取物和石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水萃取物的抗氧化能力,为进一步对密蒙花花蕾的深度开发提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

TU-1901型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);DV215CD型电子天平(上海洪纪仪器设备有限公司);TH-600B型超声波清洗器(济宁天华超声电子仪器有限公司);RE-2000B型旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限公司);PS180型万能粉碎机(江阴市康和药化机械制造有限公司)。

1.2 药品与试剂

DPPH(批号:MFC00007231,纯度:98%);2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ,批号:MFC00006045,纯度:98%);ABTS(批号:MFC00010404,纯度:98%);二丁基羟基甲苯(BHT,批号:MFC00026300,纯度:98%)均购自阿拉丁(上海)有限公司;6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-甲酸(Trolox,北京百灵威科技有限公司,批号:MFC00006846,纯度:98%);其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

密蒙花药材于2014年4月采于贵州省三都县打渔村,经黔南民族师范学院生命科学系郭治友教授鉴定为马钱科醉鱼草属植物密蒙花(*Buddleja officinalis* Maxim.)的干燥花蕾及花序,自然阴干粉碎过80目筛备用。

2 方法

2.1 密蒙花花蕾的提取

称取经粉碎的密蒙花花蕾1.0 kg,在不锈钢桶里用60%乙醇室温下浸泡3次,每次浸泡24 h后,过滤,滤液减压浓缩得浸膏227.5 g,得率为22.75%,即为密蒙花花蕾乙醇粗提物(ET)。该浸膏用适量水分散后,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取3次,然后分别浓缩后得到石油醚部位(PE)13.5 g、乙酸乙酯部位(EA)18.6 g和正丁醇部位(BU)11.1 g,以及水层部位(SH)10.2 g提取物(各部位得率分别为1.35%、1.86%、1.11%、1.02%)。分别精确称量0.1 g各部位提取物溶于100 ml甲醇中,得提取物质量浓度为1.0 g/L,然后分别稀释成0.5、1、2、4、8、16、32 μg/ml的样品溶液,封口冷藏(4℃),备用。

2.2 DPPH自由基清除能力的测定^[6-7]

分别吸取上述各提取物溶液2 ml和 0.2×10^{-3} mol/L的DPPH乙醇溶液0.5 ml置于具塞试管中,混合均匀后,在37℃

下避光静置20 min,用溶剂(无水乙醇溶液)作空白对照,于517 nm波长处测定其吸光度(A_1);吸取 0.2×10^{-3} mol/L的DPPH乙醇溶液0.5 ml和无水乙醇2 ml,同上述方法处理后测吸光度(A_0);吸取不同质量浓度的各提取物溶液2 ml和无水乙醇溶液0.5 ml,同上述方法处理后测吸光度(A_1)。以BHT作为阳性对照,测试方法与提取物相同。每份样品平行操作3次,按下式计算出清除率:清除率($I, \%$)= $[1 - (A_1 - A_0)]/A_0 \times 100\%$,并计算出半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.3 ABTS自由基清除能力的测定^[8]

将 7.4×10^{-3} mol/L的ABTS水溶液和 2.6×10^{-3} mol/L过硫酸钾水溶液按照体积比1:1混合,避光条件下反应12 h后,用95%乙醇稀释,作为工作液备用。分别取系列质量浓度提取物样品溶液0.4 ml、ABTS工作液1.6 ml于具塞试管中,混匀后,在黑暗中静置6 min,以95%乙醇为空白对照,于734 nm波长处测定其吸光度(A_1);取ABTS工作液1.6 ml、95%乙醇0.4 ml,同上述方法处理后测吸光度(A_0);吸取提取物溶液0.4 ml、95%乙醇1.6 ml,同上述方法处理后测吸光度(A_1)。以BHT作为阳性对照,测定方法与提取物相同。每份样品平行操作3次,按下式计算出清除率(I): $I(\%) = [1 - (A_1 - A_0)]/A_0 \times 100\%$,并计算出IC₅₀值。

2.4 总抗氧化能力的测定^[9-10]

利用FRAP法来评价提取物的总抗氧化能力。分别取各部位提取物系列质量浓度样品溶液0.2 ml,加入到预热至37℃的新制备的3.8 ml TPTZ溶液中,混合均匀后,在37℃下反应30 min,于593 nm波长处测定其吸光度(A)。以BHT作为对照,测定方法与提取物相同。每份样品平行操作3次,按下式计算出自由基清除能力:TEAC= $(A+0.069)/0.002c$ 。式中, A 为吸光度, c 为提取物质量浓度。结果以抗氧化当量TEAC值表示。

3 结果

3.1 不同部位提取物清除DPPH自由基的能力

ET、EA和BU提取物清除DPPH自由基的IC₅₀分别为14.93、13.75和15.14 μg/ml,清除作用强于BHT(IC₅₀为18.71 μg/ml);PE的IC₅₀为27.26 μg/ml,清除作用弱于BHT;SH对DPPH自由基的初筛清除率低于50%,故其IC₅₀未测定。密蒙花花蕾不同提取部位样品的IC₅₀测定结果见表1,提取物质量浓度对DPPH自由基清除能力的影响结果见图1。

表1 密蒙花花蕾不同提取部位样品的IC₅₀、TEAC值测定结果
Table 1 IC₅₀ and TEAC of different extract parts from flower buds of *B. flos*

提取物	IC ₅₀ , μg/ml		TEAC, μmol/g
	DPPH自由基清除法	ABTS自由基清除法	FRAP法
ET	14.93 ± 1.05	11.41 ± 2.07	1 586.25 ± 3.22
PE	27.26 ± 2.12	25.58 ± 0.98	1 054.21 ± 2.67
EA	13.75 ± 1.13	9.78 ± 2.24	1 657.67 ± 2.58
BU	15.14 ± 1.56	13.71 ± 0.87	1 328.46 ± 3.14
SH	-	-	978.97 ± 2.75
BHT(阳性对照)	18.71 ± 1.86	7.72 ± 0.92	1 581.68 ± 3.16

注:“-”为未测定

Note:“-” means not determined

由表1和图1可知,在测定质量浓度范围内,ET、PE、EA、

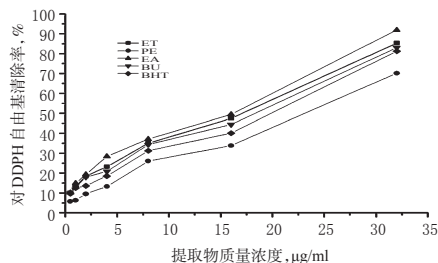


图1 提取物质量浓度对DPPH自由基清除能力的影响

Fig 1 Effect of extract mass concentration on the scavenging ability of DPPH free radical

BU和BHT对DPPH自由基的清除率均与提取物质量浓度呈正相关。在相同的质量浓度下,ET、EA和BU提取物对DPPH自由基的清除能力均高于BHT。其中EA作用最强,当质量浓度为32 µg/ml时对DPPH自由基的清除率为95%左右。

3.2 不同部位提取物清除ABTS自由基的能力

由表1可知,ET、PE、EA和BU提取物清除ABTS自由基的 IC_{50} 分别为11.41、25.58、9.78、13.71 µg/ml,清除作用低于BHT($IC_{50}=7.72$ µg/ml)。在相同质量浓度下,各部位提取物对ABTS自由基的清除率均低于BHT,在5个部位提取物中以EA清除率最高,ET清除率高于PE和BU,SH作用最弱。当质量浓度为4 µg/ml时,ET、PE、EA和BU对ABTS自由基的清除率都较低,分别为33.57%、27.11%、34.62%和31.45%;当提取物质量浓度为16 µg/ml时,ET、PE、EA和BU提取物对ABTS自由基的清除率分别为60.88%、48.32%、68.26%和58.23%,详见图2。以上结果提示密蒙花花蕾各提取物对ABTS自由基的清除能力与提取物的质量浓度呈正相关。

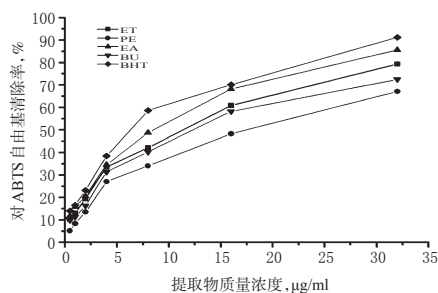


图2 提取物质量浓度对ABTS自由基清除能力的影响

Fig 2 Effect of extract mass concentration on the scavenging ability of ABTS free radical

3.3 不同部位提取物的总抗氧化能力

采用FRAP法测定不同部位的总抗氧化能力(以TEAC值表示),其TEAC值越大,表明抗氧化活性越高,结果见表1。

由表1可见,5个部位提取物与BHT的TEAC值大小顺序为EA>ET>BHT>BU>PE>SH。可见,EA萃取物抗氧化

活性最高,SH最低,这与DPPH自由基清除法和ABTS自由基清除法测定的结果一致。

4 讨论

本文通过DPPH、ABTS自由基清除法和FRAP法对密蒙花花蕾不同部位提取物的抗氧化活性进行了比较。结果表明,不同部位提取物中抗氧化活性大小顺序为EA>ET>BU>PE>SH。其中EA对DPPH自由基的清除能力最强,其 IC_{50} 值为13.75 µg/ml,低于BHT(18.71 µg/ml);对ABTS自由基的清除能力也最强,其 IC_{50} 值为9.78 µg/ml,但弱于BHT;而总抗氧化能力也是最强的,TEAC为1 657.67 µmol/g,高于BHT(1 581.68 µmol/g)。这一结果说明密蒙花花蕾的EA提取物具有较好的抗氧化能力,提示密蒙花花蕾的抗氧化活性物质主要存在于这个部位,可以将此部位提取物作进一步研究开发。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:329.
- [2] 汪毅.草药彩色图集:1[M].贵阳:贵州科技出版社,2006:121.
- [3] 崔颖,张永旺.密蒙花研究进展[J].甘肃中医学院学报,2010,27(2):65.
- [4] 康文艺,李彩芳,宋艳丽.蝉翼藤抗氧化酮成分研究[J].中国中药杂志,2008,33(16):1 982.
- [5] 李姣娟,龚建良,周尽花,等.油茶叶总黄酮的提取及其抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2008,29(12):93.
- [6] 闫杏莲,李昌勤,刘瑜新,等.头花蓼抗氧化活性研究[J].中国药房,2010,21(39):3 659.
- [7] Kumaran A, Karunakaran RJ. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of coleus aromaticus[J]. Food Chemistry,2006,97(1):109.
- [8] Li X, Lin J, Han W, et al. Antioxidant activity and mechanism of rhizoma cimicifugae[J]. Chem Cent J,2012,6(1):140.
- [9] Kang WY, Li CF, Liu YX. Antioxidant phenolic compounds and flavonoids of Mitragyna rotundifolia (Roxb.) Kuntze in vitro[J]. Med Chem Res,2010,19(9):1 222.
- [10] Kang WY, Li CF, Liu YX. In vitro antioxidant properties and in vivo lowering blood lipid of Forsythia suspense leaves[J]. Med Chem Res,2010,19(7):617.

(收稿日期:2015-06-27 修回日期:2015-08-30)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅